

**PENGESKSPRESIAN DAN KAJIAN IMUNOLOGI
KE ATAS GEN *mtp40* DARIPADA *Mycobacterium tuberculosis***

Oleh

AZIAH ISMAIL

**Tesis yang diserahkan untuk memenuhi
keperluan bagi Ijazah Sarjana Sains**

Mac 2001

Dedikasi untuk

Suami, Ahmad Filza Ismail

dan keluarga..... terima kasih untuk segalanya.

PENGHARGAAN

Alhamdulillah, tesis ini dapat saya siapkan dengan izinNya.

Penyelidikan ini telah diluluskan oleh Jawatankuasa Etika Universiti, Universiti Sains Malaysia.

Pertamanya, saya ingin mengucapkan terima kasih kepada penyelia utama, Prof Madya (Dr.) Zainul F. Zainuddin di atas segala panduan, bantuan dan tunjukajar untuk melaksanakan kajian dan menyiapkan tesis ini. Penghargaan ini juga saya tujukan untuk Prof. Madya (Dr.) Mustaffa Musa sebagai penyelia bersama yang terlibat secara langsung dengan penyelidikan ini dari peringkat awal sehingga kepada penyemakan tesis. Semoga segala tenaga yang dicurahkan akan diberi ganjaran yang sebaiknya oleh Allah s.w.t.

Tidak lupa penghargaan ini saya tujukan kepada Geran Penyelidikan IRPA RM-7 No. 06-02-05-6056 yang membiayai sepenuhnya penyelidikan ini dan Skim Biasiswa Khas USM atas pemberian elaun dan membiayai yuran pengajian saya daripada Februari 1999-Januari 2001. Terima kasih juga diucapkan kepada Hospital Kota Bharu dan Hospital USM kerana kerjasama memberikan sampel darah pesakit TB.

Kepada Dr. Mohd. Zaki Salleh, Dr. M. Ravichandran & Dr. Lalitha, Dr. Syed Hatim Nor, Dr. Mohd. Rusli Abdullah, En. Zainoodin S.A. Kader, Cik Tuan Afifah Tuan Ibrahim dan Cikgu Lim, segala bantuan dan pandangan yang diberikan selama saya menjalankan penyelidikan ini amat disanjung.

Ribuan terima kasih juga untuk semua kakitangan Makmal Mikrobiologi dan Parasitologi Perubatan terutamanya untuk Puan Rosliza, semua kakitangan Makmal Imunologi terutamanya En. Jamaruddin Mat Asan (sekarang di PPSK) dan Puan Malisa Abdullah, En. Ayob (Makmal Endokrin) dan kakitangan Jabatan Perubatan Nuklear.

Kepada rakan-rakan, Nik Norliza, Kirnpal, Robaiza, Ridhwan, Rapeah, Salwana, Rosilawani, Wan Nurhanuni, Zahera, Nasir, Yuka, Adawiyah dan staff MBDR, terima kasih di atas sokongan dan bantuan yang diberikan selama ini.

SENARAI KANDUNGAN

Kandungan	Muka sura
TAJUK	
DEDIKASI	i
PENGHARGAAN	ii
SENARAI KANDUNGAN	iv
SENARAI JADUAL	viii
SENARAI RAJAH	ix
ABSTRAK	xi
ABSTRACT	xiii
 BAB 1 PENGENALAN	 1
1.1 Sejarah tuberkulosis	1
1.2 Mikobakteria	2
1.3 Epidemiologi tuberkulosis (TB) di dunia	4
1.4 Epidemiologi tuberkulosis (TB) di Malaysia	4
1.5 Patogenesis penyakit tuberkulosis	12
1.6 Keimunan terhadap <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	14
1.7 Sejarah dan perkembangan BCG	15
1.8 Vaksin DNA	17
1.9 Pembangunan vaksin DNA terhadap tuberkulosis	20
1.10 Penemuan MTP0 dan pilihannya untuk kajian lanjut	22
1.11 Matlamat dan carta alir kajian	25
 BAB 2 BAHAN DAN METODOLOGI AM	 28
2.1 Strain bakteria dan mencit	28
2.2 Penyediaan Media	28
2.2.1 Media Lowenstein-Jensen (LJ)	28
2.2.2 Media 7H9	29
2.2.3 Media agar 7H11	29
2.2.4 Media RPMI-1640	29

2.2.5	Kaldu Luria-Bertani (LB)	30
2.2.6	Media Agar Luria-Bertani	30
2.3	Penyediaan reagen untuk ujian ELISA	31
2.3.1	Larutan penimbal sitrat-fosfat (pH 5.0)	31
2.3.2	Larutan penimbal jerapan (NaHCO_3 -0.1 M Na_2CO_3 , pH 9.2)	31
2.3.3	Larutan penimbal PBS (1X)	32
2.3.4	Larutan penimbal basuhan PBST	32
2.3.5	Larutan penimbal PBST-GS	32
2.3.6	Larutan penimbal PBST-BSA	32
2.3.7	Penyediaan serum	33
2.3.8	Penyediaan larutan substrat ELISA	33
2.3.9	Larutan pemberhenti tindak balas (2N H_2SO_4)	33
2.4	Penyediaan reagen untuk ujian LTT	33
2.4.1	Larutan penimbal ACK (6X)	33
2.4.2	Larutan PBS-Heparin (200 unit/ml)	34
2.4.3	Penyediaan ^3H - timidina	34
2.4.4	Pengasingan limfosit daripada sampel darah periferi	35
2.4.5	Pengasingan limfosit daripada limpa mencit	36
2.5	Penyediaan reagen untuk pengasingan DNA dari mikobakteria	36
2.5.1	Larutan 10X TE	36
2.5.2	Larutan lisozim (10 mg/ml)	37
2.5.3	Larutan 10% SDS	37
2.5.4	Proteinase K (10 mg/ml)	37
2.5.5	Larutan natrium klorida 5M	37
2.5.6	Larutan CTAB/NaCl	38
2.5.7	Klorofom/isoamil alkohol 24:1	38
2.5.8	Etanol 70%	38
2.5.9	Isopropanol	38
2.5.10	Prosedur pengasingan DNA dari mikobakteria	38
2.6	Analisis kehadiran DNA dengan elektroforesis	39
2.6.1	Penyediaan larutan penimbal dan gel agarosa	39
2.6.1.1	Larutan penimbal TAE 10X	39
2.6.1.2	Larutan penimbal muatan	40
2.6.1.3	Gel agarosa 0.8%	40
2.6.2	Elektroforesis gel agarosa	40
2.6.2.1	Penyediaan sampel elektroforesis	40
2.6.2.2	Larian elektroforesis	41
2.6.3	Penentuan kepekatan DNA	41
2.7	Reagen dan prosedur tindakbalas rantai polimerase (PCR)	42
2.7.1	Primer	42
2.7.2	Polimerase Taq dan larutan penimbal (Boehringer Mannheim)	43
2.7.3	Prosedur tindak balas rantai polimerase (PCR)	43
2.8	Penyediaan plasmid DNA	44
2.8.1	Penyediaan skala kecil plasmid DNA menggunakan "High Pure Plasmid Kit" (Boehringer Manhiem)	44
2.8.2	Penyediaan skala besar plasmid DNA menggunakan kit Qiagen	45

2.9	Pencernaan pembatasan DNA	46
2.9.1	Pencernaan pembatasan tunggal DNA plasmid	46
2.9.2	Pencernaan berganda	47
2.10	Penulenan DNA	48
2.10.1	Penulenan DNA menggunakan kit dari Qiagen	48
2.10.2	Penulenan DNA menggunakan kit dari Boehringer Manheim	49
2.11	Penyediaan larutan TSB dan sel kompeten untuk pengklonan DNA	50
2.11.1	Penyediaan larutan penyimpanan dan transformasi	50
2.11.2	Penyediaan sel kompeten perumah	50
2.11.3	Proses ligasi dan pengklonan DNA ke dalam plasmid	51
2.12	Penyediaan reagen dan gel untuk elektroforesis gel natrium dodesil sulfat-poliakrilamida	51
2.12.1	Akrlamida/bis (30%, 2.67%)	51
2.12.2	Larutan penimbal pemisah	52
2.12.3	Larutan penimbal penyusun	52
2.12.4	Larutan penimbal sampel	52
2.12.5	Larutan penimbal elektroforesis	53
2.12.6	Penyediaan gel pemisah (7.5%)	53
2.12.7	Penyediaan gel penyusun	54
2.12.8	Larutan pewarna Coomasie blue	54
2.13	Elektroforesis gel SDS-PAGE	54
2.14	Pemindahan protein daripada gel ke atas membran nitroselulosa (NCM)	55
2.15	Pengesanan protein antigenik	56
BAB 3 GERAK BALAS IMUN TERHADAP PEPTIDA DI KALANGAN PESAKIT TUBERKULOSIS DAN INDIVIDU YANG TERDEDAH KEPADA TB		57
3.1	Pengenalan	57
3.2	Peptida sintetik (P1-P7) yang diterbitkan daripada protein MTP40	58
3.3	Kaedah pengambilan sampel	60
3.4	Penentuan gerak balas terhadap antibodi terhadap peptida MTP40	62
3.5	Penentuan transformasi limfosit terhadap peptida MTP40	76
3.6	Perbincangan	90

BAB 4 PENGHASILAN DNA PLASMID MENKODKAN GEN <i>mtp40</i> UNTUK PEMBANGUNAN VAKSIN DNA	94
4.1 Pengenalan	94
4.2 Pengklonan gen <i>mtp40</i> ke dalam plasmid vektor pJW4303	95
4.3 Analisis pemilihan klon rekombinan pJWmtp40	97
4.3.1 Kaedah PCR	99
4.3.2 Kaedah cernaan enzim	99
4.3.3 Kaedah penjujukan DNA	101
4.4 Perbincangan	101
 BAB 5 PENGHASILAN PLASMID REKOMBINAN pGEXmtp40-I	 105
5.1 Pengenalan	105
5.2 Pengklonan gen <i>mtp40</i> ke dalam plasmid vektor pGEX-2T	105
5.3 Analisis pemilihan klon rekombinan	107
5.3.1 Kaedah PCR	109
5.3.2 Kaedah cernaan enzim	109
5.3.3 Kaedah penjujukan DNA	112
5.4 Pengekspresian klon rekombinan pGEXmtp40-I dalam <i>E. coli</i>	112
5.5 Analisis elektroforesis gel SDS-PAGE ke atas klon rekombinan pGEXmtp40-I	114
5.6 Perbincangan	116
 BAB 6 KAJIAN IMUNOGENISITI KE ATAS pJWmtp40 DI DALAM MENCIT	 117
6.1 Pengenalan	117
6.2 Protokol imunisasi	118
6.3 Analisis blot Western ke atas klon rekombinan pGEXmtp40-I menggunakan serum mencit	120
6.4 Penentuan rangsangan antibodi (ELISA) dalam mencit yang diimunisasi dengan plasmid rekombinan pJWmtp40-24	121
6.5 Penentuan rangsangan limfosit (LTT) dalam mencit yang diimunisasi dengan plasmid rekombinan pJWmtp40-24	123
6.6 Perbincangan	143
 BAB 7 PERBINCANGAN AM	 145
7.1 Perbincangan umum keseluruhan kajian	145
7.2 Kajian masa hadapan	148
 RUJUKAN	 150
 PEMBENTANGAN KERTAS KERJA	 155

SENARAI JADUAL

Jadual	Muka surat
1.1 Insiden TB yang telah dilaporkan dalam 22 negara bagi tahun 1998	5
1.2 Kadar insiden TB per 100,000 penduduk di Malaysia mengikut negeri (1994-1999)	8
1.3 Kes TB dengan HIV positif serta kematian di Malaysia 1990-1999	10
1.4 Kes TB baru yang dikesan di kalangan pekerja di bidang kesihatan, 1997-1998	11
3.1 Gerak balas antibodi positif terhadap peptida MTP40 (P1-P7) bagi pesakit TB merujuk kepada nilai titik batasan positif (min OD individu kawalan dengan dua sisihan piawai)	72
3.2 Gerak balas antibodi positif terhadap peptida MTP40 (P1-P7) bagi kumpulan HC merujuk kepada nilai titik batasan positif (min OD individu kawalan dengan dua sisihan piawai)	73
3.3 Gerak balas limfosit terhadap peptida MTP40 (P1-P7) bagi kumpulan TB merujuk kepada nilai titik batasan positif (min OD individu kawalan dengan dua sisihan piawai)	86
3.4 Gerak balas limfosit terhadap peptida MTP40 (P1-P7) bagi kumpulan HC merujuk kepada nilai titik batasan positif (min OD individu kawalan dengan dua sisihan piawai)	87
6.1 Min OD (x) bagi serum mencit C57BL/6J yang disuntik dengan plasmid pJW4303 (kawalan) dan sisihan piawai (sd) serta titik batasan positif untuk peptida P1-P7	131
6.2 Rangsangan antibodi bagi mencit C57BL/6J (S1-S6) yang disuntik dengan pJWmtp40-24 terhadap peptida P1-P7	132
6.3 Min OD (x) indeks stimulasi (SI) bagi sel limfosit mencit C57BL/6J yang disuntik dengan plasmid pJW dan sisihan piawai (sd) serta titik batasan positif bagi peptida P1-P7	141
6.4 Proliferasi limfosit bagi mencit C57BL/6J (S3-S6) yang disuntik dengan pJWmtp40-24 terhadap peptida p1-P7	142

SENARAI RAJAH

Rajah	Muka surat
1.1 Klasifikasi ahli kompleks <i>M. tuberculosis</i>	3
1.2 Kes TB yang dilaporkan per 100,000 populasi beberapa negara bagi tahun 1981-1998	6
1.3 Langkah-langkah kerja dan perancangan kajian	27
3.1 Skima kedudukan peptida (P1-P7) dalam urutan protein MTP40 dan jujukan asid aminonya	59
3.2 Skima protokol ELISA untuk penentuan tahap antibodi terhadap peptida P1-P7	63
3.3 Taburan OD bagi semua individu daripada kumpulan NC (kawalan), HC (individu yang terdedah kepada pesakit TB tanpa gejala) dan TB (pesakit TB). A-peptida P1, B-peptida P2, C-peptida P3, D-peptida P4, E-peptida P5, F-peptida P6 dan G-peptida P7	65
3.4 Peratusan individu daripada kumpulan individu yang terdedah kepada pesakit TB tanpa gejala (HC) dan pesakit TB (TB) yang menunjukkan OD yang positif merujuk kepada nilai titik batasan positif daripada kumpulan individu normal (kawalan)	75
3.5 Protokol ujian transformasi limfosit (LTT)	77
3.6 Taburan stimulasi indeks bagi semua individu daripada kumpulan NC (kawalan), HC (individu yang terdedah kepada pesakit TB tanpa gejala) dan TB (pesakit TB). A-peptida P1, B-peptida P2, C-peptida P3, D-peptida P4, E-peptida P5, F-peptida P6 dan G-peptida P7	78
3.7 Peratusan individu daripada kumpulan individu yang terdedah kepada pesakit TB tanpa gejala (HC) dan pesakit TB (TB) yang menunjukkan indeks stimulasi positif merujuk kepada nilai titik batasan positif daripada kumpulan individu normal (kawalan)	88
4.1 Carta proses pengklonan gen <i>mtp40</i> dengan vektor pJW4303 yang menghasilkan klon rekombinan pJWmtp40-24	96
4.2 A) Elektroforesis produk PCR (gen <i>mtp40</i> beserta tapak pengklonan) B) Produk PCR iaitu gen <i>mtp40</i> yang telah dituliskan untuk proses pengklonan ke dalam plasmid pJW4303	98
4.3 Analisis elektroforesis ke atas produk PCR yang menggunakan klon rekombinan pJWmtp40-24 sebagai templat	100

Rajah		Muka surat
4.4	Analisis elektroforesis ke atas produk pencernaan berganda klon pJWmtp40-24	102
4.5	Sebahagian jujukan DNA dan terjemahan asid amino bagi gen <i>mtp40</i> yang telah diklonkan ke dalam vektor pJW4303	103
5.1	Carta proses pengklonan gen <i>mtp40</i> dengan vektor pGEX-2T menghasilkan klon rekombinan pGEXmtp40-I	106
5.2	A) Elektroforesis produk PCR (gen <i>mtp40</i> beserta tapak pengklonan) B) Produk PCR iaitu gen <i>mtp40</i> yang telah dituliskan untuk proses pengklonan ke dalam plasmid pGEX-2T	108
5.3	Analisis elektroforesis ke atas produk PCR yang menggunakan rekombinan pGEXmtp40-I sebagai templat	110
5.4	Analisis elektroforesis ke atas produk pencernaan berganda klon pGEXmtp40-I	111
5.5	Sebahagian jujukan DNA dan terjemahan asid amino bagi gen <i>mtp40</i> yang diklonkan ke dalam pGEX-2T	113
5.6	Gel SDS-PAGE menunjukkan klon rekombinan pGEXmtp40-I dan pGEX-2T (kawalan) yang diaruh dengan amaun IPTG yang berbeza	115
6.1	Carta menunjukkan protokol imunisasi ke atas mencit C57BL/6J menggunakan plasmid rekombinan pJWmtp40-24	119
6.2	Analisis blot Western ke atas sel menyeluruh klon pGEX-2T dan pGEXmtp40-I	122
6.3	Bacaan OD untuk serum mencit C57BL/6J yang bertindak balas terhadap peptida MTP40 A-peptida P1, B-peptida P2, C-peptida P3, D-peptida P4, E-peptida P5, F-peptida P6 dan G-peptida P7	124
6.4	Indeks stimulasi untuk ujian gerak balas proliferasi limfosit bagi mencit C57BL/6J terhadap peptida MTP40 A-peptida P1, B-peptida P2, C-peptida P3, D-peptida P4, E-peptida P5, F-peptida P6 dan G-peptida P7	134

ABSTRAK

Pembangunan vaksin yang berkesan adalah dianggap satu kaedah utama dalam kawalan terhadap tuberkulosis di seluruh dunia. Fokus utama projek ini ialah protein MTP40 pada *M. tuberculosis* yang telah dilaporkan sebelum ini mengandungi kedua-dua epitop sel B dan sel T. Dalam kajian ini gerak balas keimunan terhadap 7 peptida yang diterbitkan daripada protein MTP40 dalam *M. tuberculosis* telah diuji dengan kaedah “enzyme linked immunosorbent assay” (ELISA) dan “lymphoblastic transformation test” (LTT) menggunakan spesimen pesakit TB (TB), individu yang terdedah kepada TB tanpa gejala (HC) dan individu kawalan (NC). Gerak balas antibodi terhadap peptida MTP40 secara umumnya didapati lebih tinggi dalam kumpulan TB berbanding dengan kumpulan HC tetapi hanya peptida P1 dan P2 yang memberikan perbezaan yang signifikan pada kedua-dua kumpulan tersebut. Di samping itu, gerak balas limfosit terhadap peptida tersebut adalah lebih tinggi di kalangan individu kumpulan HC berbanding dengan kumpulan TB di mana P1, P2, P5 dan P6 memberikan perbezaan yang signifikan. Keputusan ini mencadangkan MTP40 mungkin berguna sebagai calon vaksin. Kajian lanjut telah dilakukan dengan lebih mendalam untuk mengkaji kemungkinan ini.

Gen *mtp40* telah diklon ke dalam dua vektor pengklonan. Pengklonan gen tersebut ke dalam pJW4303 mewujudkan klon rekombinan pJWmtp40-24 yang sesuai untuk digunakan sebagai vaksin DNA. Pengklonan gen tersebut dalam vektor kedua, vektor pengekspresian pGEX-2T, menghasilkan klon rekombinan pGEXmtp40-I yang memberikan tahap pengekspresian MTP40 yang tinggi sebagai protein pertaupan kepada enzim glutathione s-transferase.

PJWmtp40-24 telah digunakan untuk imunisasi ke dalam mencit C57BL/6J. Dengan menggunakan kaedah blot Western, serum mencit yang divaksinasi telah menunjukkan kebolehan untuk mengekspresi protein MTP40 yang dihasilkan daripada pGEXmtp40-I. Melalui ELISA, ia menunjukkan bahawa pJWmtp40-24 boleh merangsang gerak balas antibodi terhadap semua 7 peptida di atas walaupun gerak balas setiap peptida berbeza daripada mencit kepada mencit yang lain. Dalam ujian LTT, spesimen daripada mencit yang diimunisasi menunjukkan gerak balas yang signifikan terhadap peptida P4 dan P6.

Keputusan di atas menunjukkan bahawa klon rekombinan pJWmtp40-24 berpotensi untuk dibangunkan sebagai calon vaksin DNA terhadap tuberkulosis.

EXPRESSION AND IMMUNOLOGICAL STUDIES
OF *mtp40* GENE OF *Mycobacterium tuberculosis*

ABSTRACT

The development of improved vaccines is considered a high priority in the effort to control tuberculosis worldwide. The focus of this project is the MTP40 protein of *Mycobacterium tuberculosis* which have been previously reported to contain both B and T cell epitopes. In this study, immune response to 7 peptides (P1-P7) derived from the MTP40 protein of *M. tuberculosis* were tested by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and lymphoblastic transformation test (LTT) using specimens from tuberculosis patients (TB), healthy contacts (HC) and normal controls (NC). Antibody response to MTP40 peptides were generally found to be higher in the TB group as compared to the HC group but only in peptides P1 ($p < 0.005$) and P2 ($p < 0.01$) were the difference between the two groups found to be statistically significant. On the other hand, lymphocyte responses to these peptides were generally found to be higher in the HC group as compared to the TB group with P1, P2, P5 and P6 showing statistically significant differences. This results suggest that MTP40 may be useful as a vaccine candidate. Further work was done to explore this possibility.

The *mtp40* gene was cloned into two vectors. Cloning of the gene into pJW4303 created the recombinant clone pJWmtp40-24 which was suitable for use as a DNA vaccine. Cloning of the gene into the second vector, pGEX-2T, an expression vector, resulted in the recombinant clone pGEXmtp40-1 which allowed for high level expression of MTP40 as a fused protein to the glutathione s-transferase (GST) enzyme.

pJWmtp40-24 was used to immunize C57BL/6J mice. Serum from the immunized mice were shown by Western blotting to be capable of recognizing the MTP40 protein exposed by pGEXmtp40-I. Through ELISA, it was shown that pJWmtp40-24 was able to stimulate antibody response to all 7 peptides described above although responses to each peptide differed from mice to mice. In LTT test, specimens from the immunized mice showed statistically significant responses to peptides P4 and P6.

The results described above showed that the recombinant clone pJWmtp40-24 has a good potential to be developed into a DNA vaccine candidate against tuberculosis.

Pengenalan AM**1.1 Sejarah tuberkulosis**

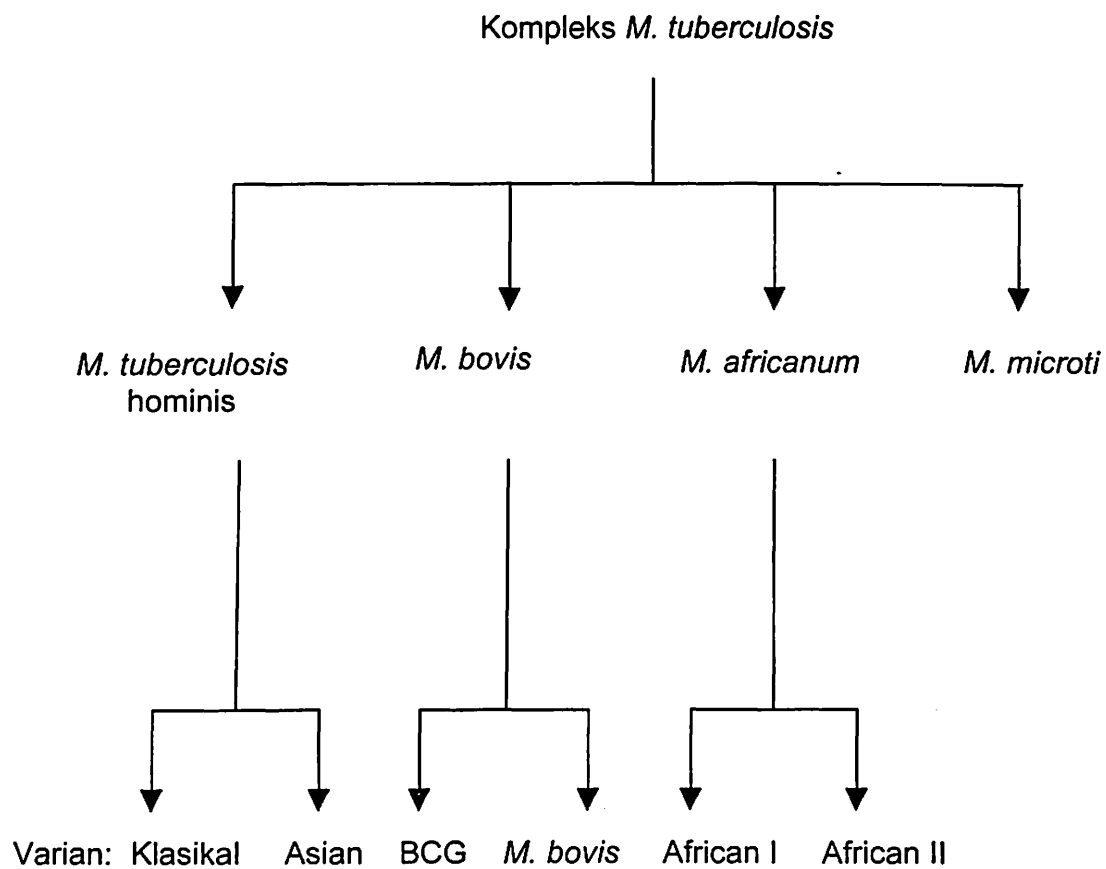
Tuberkulosis mula diketahui sebagai penyakit dalam sejarah manusia selepas bakteria dijumpai dalam tulang manusia purba Mesir. Penerangan secara klinikal tentang penyakit tuberkulosis ini telah direkodkan dalam penulisan orang-orang Hindu dan Cina. Dalam zaman Greek dan Empayar Roman, tuberkulosis dikenali oleh Aristotle dan Galen sebagai penyakit yang ditransmisikan daripada manusia ke manusia. Selepas itu Fracatius seorang pakar kanak-kanak menyatakan penyakit ini mungkin dijangkiti dalam manusia oleh partikel hidup di udara. Beliau menamakan partikel ini sebagai 'contagium vivium'. Walau bagaimanapun tidak semua orang percaya bahawa tuberkulosis adalah penyakit berjangkit kerana mereka menganggap penyakit ini disebabkan oleh faktor keturunan. Kepercayaan ini berlarutan walaupun sehingga pertengahan abad ke 19 (Kanai, 1990).

Dalam tahun 1868, Villemin menjalankan eksperimen yang menunjukkan tuberkulosis disebabkan oleh agen spesifik dan ia boleh ditransmisikan daripada manusia kepada haiwan melalui suntikan. Agen spesifik yang dinyatakan itu akhirnya dijumpai oleh Robert Koch pada 24 Mac 1882 (Kanai, 1990) dan sempena peristiwa itu, tarikh tersebut telah dijadikan sebagai Hari Tuberkulosis Sedunia (Rouillon, 1996). Koch telah berjaya mengkulturkan basilus penyebab tuberkulosis dan menghasilkan teknik pewarnaan yang kemudiannya diubahsuai oleh Ehrlich. Koch menyatakan hanya sejenis basilus sahaja yang menyebabkan tuberkulosis tetapi penemuan selepas itu menunjukkan terdapat basilus yang berbeza pada manusia, lembu, burung dan persekitaran yang boleh menyebabkan penyakit tuberkulosis (Grange, 1980).

1.2 Mikobakteria

Nama *Mycobacterium* diperkenalkan oleh Lehmann dan Neumann dalam tahun 1896 berasaskan pelikel seperti cendawan yang dihasilkan oleh bakteria tersebut bila ditumbuhkan pada media cecair. *Mycobacterium* adalah genus dalam famili Mycobacteriaceae. Genus mikobakteria dibahagikan kepada dua berdasarkan kepada kadar pertumbuhan iaitu cepat dan perlahan (Kanai, 1990). Kumpulan pertumbuhan cepat lazimnya tidak patogenik dan boleh dijumpai di dalam persekitaran. Dalam keadaan optimum, masa pertumbuhan adalah antara 30-120 minit. Kumpulan pertumbuhan perlahan mengandungi beberapa spesies yang patogenik kepada manusia dan haiwan. Masa pertumbuhannya pula adalah antara beberapa jam (hampir 20 jam bagi *Mycobacterium tuberculosis*) hingga beberapa minggu (lebih kurang 2 minggu untuk *Mycobacterium leprae*).

Bagi tujuan perubatan, mikobakteria dibahagi kepada dua kumpulan. Kumpulan pertama terdiri daripada kompleks *M. tuberculosis* manakala kumpulan kedua terdiri daripada mikobakteria atipikal. Kompleks *M. tuberculosis* terdiri daripada beberapa spesies dan varian seperti yang ditunjukkan dalam rajah 1.1. Spesies-spesies dalam kompleks *M. tuberculosis* berkongsi lebih 99% homologi pada tahap DNA. Walaupun berkait rapat, strain ini boleh dibezakan berdasarkan julat perumah asas, kevirulenan terhadap manusia dan ciri fisiologi (Heifets dan Good, 1994). Mikobakteria atipikal adalah bakteria selain daripada kompleks *M. tuberculosis*. Contoh mikobakteria yang menyebabkan penyakit kepada manusia ialah *M. kansasii*, *M. avium* dan *M. intercellulare*.



Rajah 1.1 Klasifikasi ahli kompleks *M. tuberculosis* (Collins *et al.*, 1982)

1.3 Epidemiologi tuberkulosis (TB) di dunia

Satu pertiga daripada penduduk dunia telah dijangkiti oleh tuberkulosis termasuk lapan ribu kes baru berlaku bagi setiap tahun dan angka kematian mencapai 3 juta orang (Reichman, 1997).

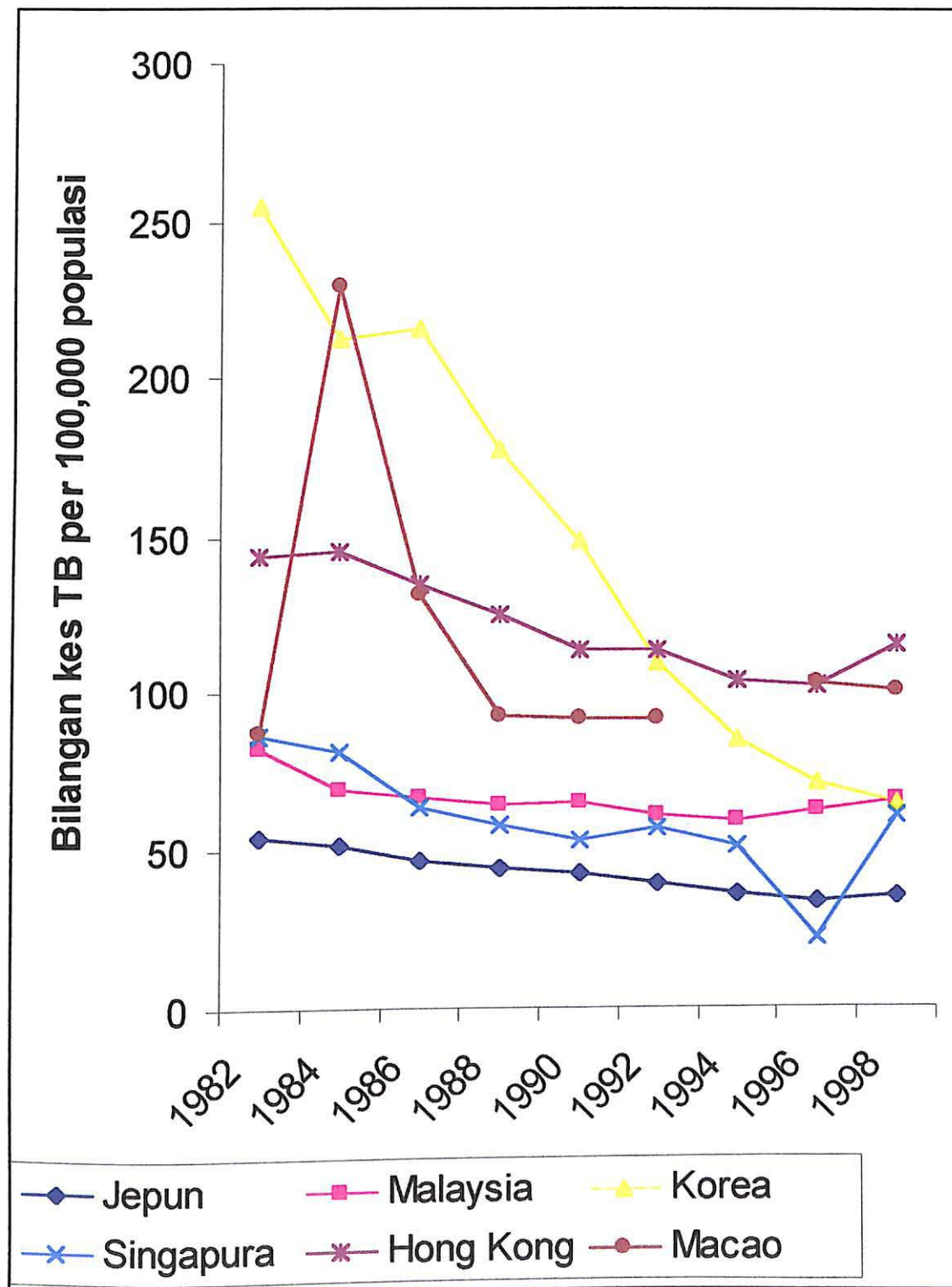
Insiden TB yang dilaporkan bagi tahun 1998 untuk 22 buah negara ditunjukkan dalam jadual 1.1. Bilangan dan kadar TB bagi setiap 100,000 penduduk bagi semua kes TB dan kes smir positif telah dilaporkan. Didapati Zimbabwe dan Kampuchea memberikan kadar pesakit TB bagi 100,000 penduduk yang paling tinggi iaitu 560.1 dan 540.5 dan begitu juga dengan kes smir positif iaitu 215.6 dan 241.6. Sementara bilangan semua kes TB yang dilaporkan bagi kedua-dua negara tersebut ialah 64,000 dan 58,000 orang dan kes smir positif pula ialah 25,000 dan 26,000 orang. Walau bagaimanapun jumlah kes TB di India dan China menunjukkan bilangan kes yang paling tinggi iaitu 1,828,000 dan 1,414,000 orang. Kadar kes TB bagi setiap 100,000 penduduk bagi India dan China ialah 186.1 dan 112.1. Bilangan kes smir positif pula ialah 818,000 dan 636,000 orang dan kadarnya bagi setiap 100,000 penduduk ialah 83.3 dan 50.7.

1.4 Epidemiologi tuberkulosis (TB) di Malaysia

Kadar kes TB yang dilaporkan di Malaysia telah menurun daripada tahun 1982-1994 tetapi meningkat semula pada tahun 1996. Rajah 1.2 pula menunjukkan kadar kes TB bagi setiap 100,000 penduduk Malaysia bersama-sama dengan Jepun, Korea Singapura, Hong Kong dan Macau. Kes yang dilaporkan bagi Jepun dan Korea menunjukkan pengurangan dari tahun 1992 hingga 1998. Bagi Hong Kong pula kadar kes TB pada mulanya menurun daripada 143.7 pada tahun 1982 iaitu kepada 102.2 pada tahun 1996. Walau bagaimanapun kadar kes meningkat semula pada tahun 1998 pada kadar 115.2. Fenomena yang sama juga berlaku di Singapura di mana kadar kes

Jadual 1.1 Insiden TB yang telah dilaporkan dalam 22 negara bagi tahun 1998 (Global Tuberculosis Control, Laporan WHO 2000)

Negara	Semua kes		Kes smir positif	
	X 1000	Kadar/100,000	X 1000	Kadar/100,000
India	1828	186.1	818	83.3
China	1414	112.1	636	50.7
Indonesia	591	286.6	266	128.7
Bangladesh	305	244.7	137	110.1
Pakistan	268	181	120	81.3
Nigeria	259	243.4	113	106.1
Filipina	224	306.7	101	137.9
Afrika Selatan	172	437.9	70	177.3
Etiopia	160	268.6	67	112.8
Vietnam	147	189.3	66	85.2
Rusia	156	157	70	47.5
Kongo	130	263.7	55	112.1
Brazil	124	74.7	55	33.3
Tanzania	99	308.6	41	127.5
Kenya	86	296.8	35	121.7
Thailand	85	140.9	37	62
Myanmar	81	181.9	36	81.9
Afghanistan	75	353.1	34	158.9
Uganda	68	332.3	27	132.9
Peru	66	265	29	118.7
Zimbabwe	64	560.1	25	215.6
Kampuchea	58	540.5	26	241.6
Jumlah	6461	175.1	2866	
Jumlah global	8083	137	3574	



Rajah 1.2 Kes TB baru yang dilaporkan per 100,000 populasi beberapa negara bagi tahun 1981-1998

menunjukkan penurunan daripada tahun 1982 hingga 1996 tetapi meningkat semula pada tahun 1998.

Kadar kes TB di setiap negeri di Malaysia bagi tahun 1994-1999 ditunjukkan dalam jadual 1.2. Perbandingan yang dibuat untuk tahun 1985-1999 menunjukkan corak kadar kes TB yang berbeza di semua negeri di Malaysia. Kadar insiden TB yang paling tinggi bagi tahun 1999 adalah di Sabah diikuti dengan Wilayah Persekutuan. Walau bagaimanapun, bila dibandingkan daripada tahun 1985-1999, Sabah menunjukkan corak kadar insiden TB yang menurun iaitu 199.3 pada tahun 1985 kepada 143.4 pada tahun 1999. Bagi Wilayah Persekutuan pula, kadar insiden meningkat daripada 82.7 (1985) kepada 121.7 (1999) (Laporan Tahunan Pusat TB Kebangsaan 1999).

Peratusan mengikut umur yang paling besar bagi pesakit TB ialah daripada 16-49 tahun. Bagi kanak-kanak iaitu di dalam kumpulan umur 0-14 tahun, bilangan kes yang dikesan pada tahun 1999 adalah 403 kes atau 3% daripada jumlah keseluruhan kes TB bagi tahun tersebut. Kes TB di kalangan kanak-kanak paling banyak berlaku di Sabah dengan 211 kes diikuti dengan Sarawak dan Perak. Kes yang dikesan pada peringkat umur ini sejak 1987-1999 menunjukkan peratusan hanya sekitar 3%.

Peningkatan bilangan TB meningitis dikesan sejak tahun 1996. Dalam tahun 1994 terdapat 53 kes TB meningitis yang dikesan. Kes ini menurun kepada 39 kes pada tahun 1995 tetapi meningkat semula pada tahun 1996 dengan 54 kes. Peningkatan kes TB meningitis ini terus meningkat sehingga kepada 74 kes pada tahun 1999. Kebanyakan kes adalah di kalangan lelaki yang berumur 35-64 tahun (Laporan Tahunan Pusat TB Kebangsaan, 1997-1999).

Jadual 1.2 Kadar insiden TB per 100,000 penduduk di Malaysia mengikut negeri (1994-1999)

Negeri	1985	1987	1989	1991	1993	1995	1997	1999
Perlis	89.4	80.3	84.5	55.1	61.4	60.9	57.2	46.4
Kedah	53.4	47.7	43.7	40.2	37.8	40.3	46.4	46.5
P. Pinang	69.8	62.6	59.2	60.1	63.2	58.4	66.8	68.7
Perak	53.4	47.1	41.6	33.6	45.1	42.3	46.6	47.9
Selangor	13.1	14.7	15.1	16.8	15.0	31.2	19.2	21.3
W. Persekutuan	82.7	87.5	77.2	87.7	102.0	83.5	113.7	121.7
N. Sembilan	30.5	42.4	37.2	31.1	27.1	32.1	37.9	44.5
Melaka	41.5	39.9	34.5	32.3	32.8	36.2	37.3	48.0
Johor	35.5	32.8	28.9	29.0	28.8	29.3	38.5	43.4
Pahang	39.0	35.2	32.8	35.3	44.8	41.6	45.2	49.3
Terengganu	51.5	52.3	50.4	54.5	37.9	43.9	45.6	44.1
Kelantan	86.2	74.5	67.2	64.9	61.0	56.2	52.8	55.5
Sabah	199.3	216.1	195.8	202.1	188.1	163.3	151.9	143.7
Sarawak	116.3	115.8	101.7	89.3	91.7	85.8	87.6	87.4
Malaysia	68.2	66.9	61.2	60.2	62.2	58.0	63.1	65.6

Faktor-faktor yang mengarah kepada peningkatan TB ialah dengan peningkatan kes HIV, rawatan bagi penyakit TB yang tidak lengkap menyebabkan terbitnya “multi-drug resistant” dan juga pendatang asing.

Kumpulan yang mempunyai risiko yang tinggi terhadap jangkitan TB ialah

1. Individu yang dijangkiti HIV. Jumlah TB yang berkoinfeksi dengan HIV meningkat sejak tahun 1990. Terdapat 6 kes yang dilaporkan dalam tahun 1990 dengan 1 kematian tapi dalam tahun 1999 bilangan bertambah kepada 603 kes dengan 202 kematian. Pada tahun 1999, Johor menunjukkan bilangan TB-HIV yang terbesar dengan 93 kes diikuti dengan Selangor, 89 kes dan Pulau Pinang, 79 kes. Walau bagaimanapun Pulau Pinang dilaporkan memberikan bilangan kematian yang paling tinggi akibat TB-HIV iaitu 40 kes. Jumlah bilangan kes TB dengan HIV positif serta kematian di Malaysia ditunjukkan pada jadual 1.3.
2. Pekerja dalam bidang penjagaan kesihatan seperti doktor, jururawat dan yang berkaitan dengan hospital dan klinik kesihatan. Kajian yang telah dijalankan daripada 1997-1998 di Malaysia mendapati kes TB di kalangan pekerja di bidang kesihatan ini meningkat daripada 51 kes pada tahun 1997 kepada 91 kes pada tahun 1998 (Jadual 1.4) (Laporan TB Kebangsaan, 1999).
3. Pendatang asing. Dalam tahun 1993 terdapat 1368 kes TB yang baru dikesan di kalangan pendatang asing. Bilangan kes TB ini menurun pada tahun 1994 dengan 1230 kes. Seterusnya kes TB di kalangan pendatang asing ini dikesan sebanyak 1361 kes (1995), 1755 kes (1996), 1767 kes (1997), 1679 kes (1998) dan 1433 kes (1999). Kebanyakan kes ini adalah di kalangan pendatang asing dari Indonesia dan Filipina. Wilayah Persekutuan dan Johor menunjukkan bilangan kes TB yang tinggi di kalangan pendatang asing (Laporan Tahunan Pusat TB Kebangsaan, 1999).

Jadual 1.3 Kes TB dengan HIV positif serta kematian di Malaysia 1990-1999

Tahun	Bilangan kes	Bilangan kematian	Peratus Kematian (%)
1990	6	1	16.7
1991	31	3	9.7
1992	54	6	11.1
1993	60	9	15.0
1994	137	23	16.8
1995	213	26	12.2
1996	262	44	16.8
1997	322	63	19.6
1998	545	166	30.5
1999	690	202	29.2

Jadual 1.4 Kes TB baru yang dikesan di kalangan pekerja di bidang kesihatan, 1997-1998

Pesakit TB	1997	1998
Doktor	6	2
Jururawat	12	34
Pekerja Makmal	2	4
Pembantu Kesihatan	4	10
Atendan	13	23
Pelatih/pengajar	5	8
Lain-lain	9	10
Jumlah	51	91

1.5 Patogenesis penyakit tuberkulosis

M. tuberculosis disedut oleh seseorang melalui titisan yang mengandung satu hingga tiga sel bakteria dan tahap ini dipanggil jangkitan primer. Partikel ini dibawa oleh aliran udara merebak ke semua bahagian paru-paru (Wiegeshaus *et al.*, 1989). Fasa pertama jangkitan dijelaskan oleh Dannenberg (1991) sebagai pertalian simbiotik di antara perumah dan parasit. Dalam fasa ini perumah belum lagi dijangkiti dan makrofaj belum diaktifkan oleh sitokin. Dalam keadaan ini pembahagian sel mikobakteria tidak terhalang.

Mikobakteria akan diambil secara fagositosis (Colston, 1996) oleh makrofaj melalui reseptor komplemen dan reseptor manosa yang diekspresi pada permukaan makrofaj tersebut (Schlesinger, 1993). Bakteria mungkin akan dimusnahkan atau mula membahagi beberapa hari selepas fasa lag (Andersen, 1997). Sitokin pro-inflamatori seperti interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), faktor tumor nekrosis- α (TNF α) dan kimokin seperti protein inflamatori 1 serta interferon aruhan protein 10 yang dirembeskan daripada makrofaj yang dijangkiti menyebabkan penglibatan monosit dan limfosit daripada darah dan berlakunya proses inflamatori.

Dalam model mencit contohnya, tanda-tanda pertama imuniti spesifik terhasil 2 minggu selepas jangkitan (Orme, 1987 & Andersen *et al.*, 1991) dan mencetuskan pengeluaran sitokin oleh sel T limfosit yang spesifik. Sitokin akan mengaktifkan makrofaj dan mempercepatkan gerak balas limfosit. Bila proses ini berlanjutan, monosit matang di dalam sel epiteloid dan sel multi-nukleus yang besar dikelilingi oleh sel T limfosit lalu membentuk granuloma (Turk *et al.*, 1982). TNF- α ialah sitokin yang memainkan peranan penting dalam pembentukan granuloma kerana peneutralan *in vivo* TNF semasa jangkitan menyebabkan pembentukan granuloma yang berkurangan dan bakteria membahagi dengan banyak tanpa kawalan (Andersen, 1997).

Status penyakit ditentukan oleh keseimbangan dinamik faktor perumah dan parasit. Bagi individu yang rintang, penyakit ini terkawal dan individu ini adalah asimptomatik. Jika perumah dapat mengawal jangkitan, lesi akan dikelilingi kapsul dan ditinggalkan dalam bentuk kalsifikasi. Bakteria tersebut mungkin hidup dalam keadaan dorman untuk beberapa tahun sehingga berlakunya penurunan pengawalaturan sistem imun perumah. Apabila ini berlaku, sel bakteria yang dorman akan mula tumbuh dan membahagi. Keadaan ini dikenali sebagai pengaktifan semula TB (Smith *et al.*, 1989) yang juga dipanggil jangkitan sekunder.

Bagi individu yang rentan pula, proses pembahagian bakteria terus berlaku, lesi primer membesar dan sesetengah bakteria diangkut ke bahagian nodus limfa menyebabkan tindakbalas granuloma bertambah. Kombinasi lesi primer dan perubahan dalam kawasan nodus limfa dikenali sebagai kompleks primer. Kajian lesi kavitari menunjukkan zon apikal paru-paru ialah bahagian yang mudah dimusnahkan serta membenarkan bakteria tersebar melalui darah di tapak berlakunya jangkitan primer. Bila penyakit berterusan, amplifikasi gerak balas imun mengarah kepada inflamasi yang lebih teruk, kemusnahan tisu, nekrosis dan pembentukan lesi kavitari (Dannenberg, 1991).

Lisis makrofaj mungkin menyebabkan bakteria yang hidup dirembes keluar ke dalam darah dan menyebabkan jangkitan dalam pelbagai organ (Wiegeshaus *et al.*, 1989). Keadaan ini dipanggil jangkitan miliari. Lesi miliari boleh berlaku di kawasan seperti nodus limfa, paru-paru, buah pinggang, kelenjar adrenal, sumsum tulang, limpa, hati, otak dan organ genital (Connors *et al.*, 1988).

1.6 Keimunan terhadap *Mycobacterium tuberculosis*

Umumnya, gerak balas keimunan yang penting terhadap bakteria intrasel adalah keimunan perantara sel. Keimunan perantara sel terbahagi kepada dua jenis tindak balas iaitu membunuh mikrob secara fagositosis yang dihasilkan melalui pengaktifan makrofaj oleh IFN γ dan lisis sel yang dijangkiti oleh sel T sitotoksik (CD8+). Protein antigen daripada bakteria merangsang kedua-dua sel T, CD8+ dan CD4+. Sel T CD4 bertindak balas dengan kompleks antigen dan molekul MHC II yang dipersembahkan oleh antigen persembah sel (APC). Contohnya ialah "purified protein derivative" (PPD) (Abbas *et al.*, 1994).

Sesetengah mikrob mengaruhkan perubahan sel T penolong CD4+ kepada fenotip Th1. Kedua-dua sel pembunuh semulajadi (NK) yang menghasilkan IFN γ dan makrofaj yang mengeluarkan IL-12 membantu perubahan tersebut. Th1 juga merembeskan IFN γ supaya makrofaj diaktifkan untuk menghasilkan oksigen reaktif dan enzim yang membunuh bakteria intrasel. IFN γ juga merangsang penghasilan isotip antibodi (contohnya IgG2a dalam mencit) yang mengaktifkan komplemen dan opsonisasi bakteria untuk fagositosis. Th1 juga merembeskan TNF yang mengakibatkan inflamasi setempat. Jika bakteria boleh hidup dalam sel dan mengeluarkan antigen ke permukaan sel, sel T sitotoksik (CTLs) CD8+ akan dirangsang. CTLs menghasilkan IFN γ dan berkebolehan juga untuk melisis sel yang dijangkiti (Abbas *et al.*, 1994).

Makrofaj dan sel T sitotoksik teraktif yang berlaku sebagai gerak balas kepada mikrob intrasel juga boleh menyebabkan kemusnahan tisu. Fenomena ini dipanggil tindak balas hipersensitiviti jenis lewat (DTH-"delayed type hypersensitivity").

Sel T penolong CD4+ juga boleh dalam bentuk fenotip Th2 yang dicirikan dengan penghasilan IL-4 dan IL-10. IL-4 dan juga TGF- β menindas gerak balas Th1. Walaupun gerak balas Th2 boleh dikesan, penyakit yang disebabkan oleh mikobakteria secara amnya mempunyai gerak balas Th1 dan paras IFN γ yang tinggi (Andersen, 1997).

1.7 Sejarah dan perkembangan BCG

BCG adalah satu-satunya vaksin yang digunakan di dunia terhadap penyakit tuberkulosis. BCG berasal dari perkataan 'Bacille Calmette Guerin'. Ianya merupakan basilus yang diatenuasikan oleh 2 orang saintis yang bernama Calmette dan Guerin. Strain yang dipilih oleh Calmette dan Guerin telah dipencilkan dari lembu yang dijangkiti tuberkulosis mastitis iaitu melalui inokulasi susu lembu tersebut kepada serum yang dicampurkan gliserol. Strain tersebut dipanggil 'Lait Nocard' dan telah dihantar kepada Calmette di Institut Pasteur. Pemilihan strain yang berasal dari lembu untuk penghasilan vaksin terhadap TB dalam manusia berlaku kerana beberapa sebab:

1. Vaksin tersebut pada mulanya adalah untuk kegunaan lembu dan bukannya manusia.
2. Percubaan untuk melemahkan strain dari manusia telah gagal.
3. Strain dari lembu biasanya mempunyai kevirulenan yang amat rendah terhadap manusia.

Selepas atenuasi telah disahkan dalam haiwan, BCG telah diberikan terhadap bayi melalui mulut oleh Weill-Halle pada tahun 1921. Tahap keberkesanan BCG sebagai vaksin untuk menghalang penyakit tuberkulosis didapati berbeza dari satu kawasan ke kawasan yang lain. Sebagai contoh percubaan BCG di Britain yang bermula pada tahun 1951 menunjukkan tahap pencegahan penyakit 70% hingga 80% sekurang-kurangnya dalam 10 tahun pertama. Dua percubaan di bahagian selatan India pula

menunjukkan tahap pencegahan 0-30%. Keadaan ini mungkin disebabkan oleh keberkesanan pencegahan tuberkulosis berbeza-beza di antara satu strain BCG dengan strain BCG yang lain (Grange *et al.*, 1983).

Strain BCG yang digunakan dengan meluas pada masa ini ialah BCG Pasteur, BCG Glaxo, BCG Copenhagen dan BCG Japan yang menunjukkan sifat morfologi, biokimia dan imunologi yang berbeza. Dianggarkan lebih dari 2 juta penduduk telah diimunisasikan dengan BCG (Bloom dan Fine, 1994).

Vaksin BCG gagal untuk memberi perlindungan terhadap penyakit tuberkulosis di beberapa kawasan di dunia. "Multi-drug resistant-TB" (MDR-TB) dan kombinasi jangkitan *M. tuberculosis* dengan HIV merupakan antara faktor yang menggalakkan penggunaan teknik moden untuk memahami penyakit ini (Fine, 1988).

Kajian oleh Philipps *et al.* (1996) menunjukkan terdapat perbezaan antara peta fizikal genom *M. bovis* BCG Pasteur berbanding dengan peta genom *M. tuberculosis* H37Rv dan *M. bovis*. Kawasan yang berkaitan digunakan sebagai prob untuk hibridisasi bagi menguji perbezaan strain BCG, *M. bovis* dan *M. tuberculosis* H37Rv. Apa yang didapati adalah terdapat sebilangan delesi berlaku sehingga saiz 10 kb. Selitan dan polimorfisma yang lain juga telah dikesan.

Perbezaan kawasan yang dikesan dalam *M. bovis* BCG berbanding dengan *M. bovis* dan *M. tuberculosis* terjadi disebabkan sebahagian jujukan nukleotida pada genom *M. tuberculosis* tidak terdapat pada *M. bovis* atau BCG. Perbezaan tersebut disahkan oleh analisis hibridisasi menggunakan kosmid yang membawa segmen kromosom *M. tuberculosis* sebagai prob (Philipps *et al.*, 1996).

Mahairas *et al.* (1996) telah mengenal pasti dan membuat pencirian terhadap 3 kawasan yang dikenali sebagai RD1, RD2 dan RD3 yang telah terdedesi dari kromosom BCG. RD2 dan RD3 tersebut mengkodkan antigen MPT64 dan ESAT-6 sementara RD1 mengandungi lokus pengawal atur yang mengarah kepada penghasilan beberapa protein. Lagranderie *et al.* (1996) pula telah menunjukkan bahawa strain BCG yang berbeza boleh dikelaskan berdasarkan kepada kadar pertumbuhan dan gerak balas keimunan apabila diaruhkan dalam mencit. Kajian lanjut yang telah dilakukan oleh Gordon *et al.* (1999) mendapati terdapat 10 kawasan terdedesi (RD1-RD10) pada *M. bovis* BCG berbanding *M. tuberculosis*.

1.8 Vaksin DNA

Vaksin perlu dibangunkan untuk sesuatu penyakit jika penyakit tersebut menjangkiti ramai orang dan masih tidak mempunyai vaksin atau mempunyai vaksin tetapi tidak berkesan sepenuhnya. Vaksin alternatif harus dibangunkan untuk penyakit yang sedang merebak dan perlu dikawal.

Pembangunan vaksin mempunyai empat tujuan iaitu mencegah jangkitan, mencegah penyakit, menghalang pemindahan penyakit dan mencegah komplikasi terutama yang serius akibat infeksi tersebut. Vaksin yang berkesan dan baik mempunyai sama ada kesemua fungsi atau sekurang-kurangnya salah satu daripadanya (Alison, 1988). Di samping itu ianya mesti mudah disediakan dan murah juga stabil pada suhu yang berubah. Jenis vaksin semasa termasuk protein subunit dan vaksin DNA.

Vaksin DNA telah dibangunkan dengan teknologi pengklonan yang mengkodkan imunogen kepada vektor pengekspresian. Plasmid ini ditransformasikan ke dalam bakteria. Pembiakan bakteria menyebabkan amplifikasi plasmid. Plasmid dituliskan daripada kultur bakteria. Plasmid DNA yang dituliskan disuntik ke dalam haiwan.

Vaksin DNA dilaporkan boleh merangsang kedua-dua sel T sitolitik dan sel B. Ini disebabkan keupayaan protein yang disintesis dalam sel masuk ke tapak jalan untuk dipersembah oleh kedua-dua MHC kelas I dan MHC kelas II (Robinson dan Torres, 1997).

Vaksin DNA ialah plasmid bakteria yang mempunyai promoter, gen yang diperlukan dan jujukan pemberhenti transkripsi atau poliadenilasi (Donnelly *et al.*, 1997). Promoter dan jujukan poliadenilasi akan mengarah kepada pengekspresian sesuatu gen tersebut dalam sel mamalia. Promoter yang kerap kali digunakan adalah dari sitomegalovirus (CMV). Penggunaan CMV intron A dalam jujukan bahagian atas promoter adalah berkesan untuk pengekspresian cDNA mikrob. Intron atas ini menyediakan transkripsi mikrob dengan signal untuk pemprosesan dan pengangkutan sebagai mRNA eukariot. Jujukan poliadenilasi yang biasa digunakan pula adalah daripada gen untuk hormon pertumbuhan bovin. Jujukan poliadenilasi ini akan meminimumkan transkripsi pada plasmid tersebut (Robinson HL dan Torres CAT, 1997). Plasmid dihasilkan tanpa asalan replikasi (*ori*) yang berfungsi dalam sel eukariot tetapi *ori* yang sesuai untuk penghasilan dalam kuantiti yang banyak dalam *E. coli*. Plasmid tersebut tidak bereplikasi dalam sel mamalia dan tidak berintegrasi ke dalam kromosom haiwan perumah. Kawasan yang rintang terhadap sesuatu antibiotik yang sesuai adalah perlu untuk pertumbuhan *E. coli* (Donnelly *et al.*, 1997).

Penggunaan vaksin DNA dalam imunisasi terhadap sesuatu penyakit mempunyai kebaikan dan kelemahan. Antara kebbaikannya adalah penghasilan dan penulenan yang senang dan tidak memerlukan kos yang banyak (Xiang *et al.*, 1997; Ramsay *et al.*, 1997). Vaksin DNA adalah stabil dan tidak memerlukan "cold chain" dan menyediakan adjuvannya sendiri dalam bentuk jujukan CpG (Xiang *et al.*, 1997). Melalui vaksin DNA, ekspresi antigen adalah berpanjangan yang akan merangsang sistem keimunan secara berterusan (Tighe *et al.*, 1998; Corr dan Tighe, 1997).

Plasmid DNA ini juga merangsang gerak balas CTL dan Th1 yang lebih baik berbanding dengan vaksinasi menggunakan protein. Vaksinasi dengan DNA boleh merangsang kedua-dua gerak balas MHC kelas I (CD8+) dan II (CD4+) (Corr dan Tighe, 1997). Antigenisiti protein tertentu boleh dimanipulasikan di peringkat cDNA tanpa perlukan penghasilan dan penulenan protein. Penggabungan gen yang dikehendaki dengan gen yang mengkodkan sitokin dan molekul "costimulatory" akan memberikan gerak balas yang berikutnya kepada DNA yang mengkodkan gen yang dikehendaki tersebut (Tighe *et al.*, 1998). Selain daripada itu, penggunaan vaksin DNA membolehkan epitop yang paling berkesan dipilih, membuang dan mengubahsuai epitop yang kurang berkesan, membuat sasaran kepada tapak jalan antigen persembah yang berbeza atau menggunakan DNA yang mengkod sitokin dan sebagainya (Lowrie *et al.*, 1997).

Penggunaan vaksin DNA dalam penyakit yang disebabkan oleh bakteria mungkin mengalami masalah disebabkan perbezaan antara gen prokariot dan eukariot. Perbezaan juga terdapat pada produk gen seperti kestabilan mRNA, bias kodon, struktur sekunder jujukan permulaan dan glikosilasi. Masalah ini boleh diatasi dengan mensintesis semula gen bakteria untuk menghasilkan jujukan baru yang boleh diekspresi dengan banyak oleh sel eukariot (Strugnell *et al.*, 1997).

Penyebab utama kegagalan BCG ialah pra-imunisasi dengan pendedahan terhadap mikobakteria walaupun fakta ini belum dibuktikan dan tiada penjelasan kenapa ini mengganggu vaksinasi. Satu kemungkinan ialah mikobakteria persekitaran mungkin boleh memusnahkan gerak balas keimunan, ini menyebabkan keimunan pertahanan tidak lagi dirangsang oleh BCG (Stanford dan Rook, 1983).

1.9 Pembangunan vaksin DNA terhadap tuberkulosis

Banyak kajian dilakukan oleh penyelidik terhadap gen-gen tertentu untuk membangunkan vaksin DNA terhadap tuberkulosis. Contohnya, Huygen *et al.* (1996) menggunakan plasmid rekombinan yang dinamai DNA-85A dan mendapati gen tersebut boleh menghasilkan gerak balas spesifik sel Th1, sel sitotoksik CD8+, titer antibodi yang tinggi bagi kedua-dua isotip IgG1 dan IgG2a dan memberi perlindungan terhadap jangkitan *M. tuberculosis*. Tascon *et al.* (1996) pula melaporkan vaksin DNA yang mengekspresi protein GroEL boleh melindungi mencit terhadap *M. tuberculosis*. Mencit yang divaksinasi dengan DNA protein groEL menghasilkan gerak balas spesifik Th1 yang diukur dengan rembesan IFN γ .

Denis *et al.* (1998) telah menganalisa dengan lebih mendalam mengenai gerak balas imun antigen spesifik sel T CD4+ dan CD8+ dalam mencit BAB/c yang diberikan vaksin DNA-85A dan membuat perbandingan dengan gerak balas dalam mencit yang dijangkiti *M. tuberculosis* H37Rv secara intravenus. Dengan mengukur rembesan interleukin-2 dan interferon gama, didapati vaksin DNA merangsang gerak balas sel T yang lebih tinggi berbanding dengan jangkitan *M. tuberculosis*. Tambahan pula sel T sitotoksik boleh dihasilkan dengan vaksinasi plasmid DNA tetapi tidak selepas jangkitan *M. tuberculosis*.

Zhu *et al.* (1997) pula mengkaji perlindungan yang dihasilkan oleh vaksin DNA menggunakan protein 38 kDa. Gen yang mengkodkan protein 38 kDa telah diklonkan ke dalam plasmid pcDNA3 sebelum divaksinasikan ke dalam mencit C57BL/6. Didapati gerak balas keimunan adalah tinggi bagi Th1 yang dicirikan dengan pengeluaran IFN γ .

Bonato *et al.* (1998) telah mengkaji untuk mengenalpasti dan mencirikan sel T dalam mencit yang diberikan vaksin DNA hsp65 dan mencit yang dijangkiti dengan *M. tuberculosis*. Semasa jangkitan atau selepas imunisasi, sel T CD4+/CD8- dan CD8+/CD4- meningkat dalam limpa. Semasa jangkitan, majoriti sel CD44 adalah positif rendah dan menghasilkan IL-4. Selepas imunisasi pula, kebanyakan sel adalah CD44 positif tinggi dan menghasilkan IFN γ . Oleh itu jumlah populasi sel CD8+/CD4- yang dituliskan dari limpa mencit yang diimunisasi dengan hsp65 melindungi daripada penyakit dengan lebih baik untuk mencit yang dijangkiti.

Silva *et al.* (1999) menggunakan DNA yang mengkodkan protein hsp65 dan membandingkan dengan imunisasi menggunakan BCG ke atas mencit BALB/c. Perlindungan terhadap jangkitan *M. tuberculosis* bagi mencit yang diimunisasi dengan DNA-hsp65 adalah berkaitan dengan kehadiran populasi sel T CD8+/CD44 tinggi yang menghasilkan IFN γ manakala mencit yang diimunisasi dengan BCG adalah CD4+/CD44 rendah yang menghasilkan IFN γ . Ini menunjukkan perlindungan terhadap *M. tuberculosis* bagi mencit yang divaksinasi dengan DNA-hsp65 adalah lebih baik dari mencit yang diimunisasi dengan BCG. Fenotip CD44 tinggi adalah berkaitan dengan gerak balas Th1.

Kamath *et al.* (1999) menggunakan gen dari protein *M. tuberculosis* iaitu MPT64 (23k Da), Ag85B (30k Da) dan ESAT-6 (6 kDa) untuk membangunkan vaksin DNA. Plasmid rekombinan telah dihasilkan menggunakan vektor pJW4303 (untuk kombinasi MPT64, Ag85B dan ESAT-6), plasmid pJ123 (DNA-64), pJ130 (DNA-85B) dan pJIE6 (DNA-E6). Beliau telah menggunakan plasmid rekombinan ini untuk imunisasi mencit C57B/6 dan mencit tersebut didedahkan kepada *M. tuberculosis*. Hasil kajian menunjukkan ko-imunisasi antara ketiga-tiga gen memberikan darjah perlindungan yang lebih tinggi

berbanding dengan setiap satu gen yang digunakan. Walau bagaimanapun bila dibandingkan dengan BCG, tahap perlingkungannya adalah lebih rendah.

Kajian imunogenisiti bagi vaksin DNA yang mengekspresikan protein tuberkulosis yang bertaup dengan jujukan signal tisu pengaktif plasminogen (TPA) telah dijalankan oleh Li *et al.* (1999). Dengan menggunakan gen yang mengkodkan ESAT-6, MPT-64, KatG atau HBHA, mereka membandingkan keberkesanan vaksin DNA yang mengkodkan protein natif bagi gen tersebut dengan protein yang sama bertaup dengan TPA. Hasil daripada kajian mendapati, protein yang bertaup dengan TPA boleh merangsang mekanisme pertahanan yang lebih baik. Walau bagaimanapun, gerak balas keimunan yang dihasilkan oleh penyuntikan dengan BCG masih lebih baik dari kedua-duanya.

Seterusnya Lowrie *et al.* (1999) membuktikan bahawa vaksinasi menggunakan DNA dari Hsp65 bukan sahaja berfungsi sebagai vaksin tetapi juga sebagai terapi untuk tuberkulosis. Kesan terapeutik vaksin DNA dapat dilihat dengan penukaran polar gerak balas Th2 kepada Th1 ke atas mencit yang dikaji.

1.10 Penemuan MTP40 dan pemilihannya untuk kajian lanjut

MTP40 adalah protein bersaiz 40 kDa yang telah diisolasikan daripada analisis SDS-PAGE (Parra *et al.*, 1991) bagi protein antigen yang hanya terdapat pada pesakit TB (Patarroyo *et al.*, 1986). Protein tersebut telah diimmunisasi ke dalam amab dan serum yang diperolehi daripadanya dinamakan TB40. Antiserum poliklon amab (TB40) ini telah digunakan untuk penyaringan librari genom *M. tuberculosis* (genom *M. tuberculosis* yang dicernakan dengan enzim *EcoRI* diligasi dengan lambda gt11). Penjujukan DNA telah dilakukan ke atas klon yang positif. Didapati saiz protein tersebut adalah 14 kDa. Dengan teknik penghibridan disimpulkan bahawa *mtp40* hanya spesifik untuk *M. tuberculosis* sahaja (Parra *et al.*, 1991).

Falla *et al.* (1991) telah menemui epitop sel B dan T dalam protein MTP40 menggunakan kaedah pemetaan epitop. Kajian ini telah dilanjutkan dengan dua asai imunologi iaitu asai imunojerapan untaian enzim (ELISA; "enzyme linked immunosorbent assay") dan asai proliferasi limfosit (LTT; "lymphoblastic transformation test"). Dengan menggunakan tujuh peptida (P1-P7) yang diterbitkan daripada protein MTP40, dua ujian tersebut telah digunakan terhadap 4 kumpulan iaitu pesakit aktif TB dengan jumlah basilus yang tinggi (BK+), pesakit aktif TB dengan jumlah basilus yang rendah (BK-), individu yang terdedah dengan penyakit tetapi tanpa gejala (HH) dan individu normal (kontrol). Kumpulan pesakit aktif TB didapati menghasilkan antibodi yang lebih tinggi melalui ujian ELISA manakala kumpulan individu yang terdedah kepada TB tanpa gejala menunjukkan proliferasi limfosit yang lebih tinggi melalui ujian LTT. Peptida P4 menunjukkan peratusan penghasilan antibodi yang paling tinggi di kalangan pesakit manakala proliferasi limfosit paling tinggi terhadap P7 di kalangan individu yang terdedah kepada TB tanpa gejala.

Leao (1993) pula telah menggunakan kaedah yang sama menggunakan peptida P1-P7 ke atas empat kumpulan individu seperti Falla *et al.* (1991). Beliau mendapati pada keseluruhannya, penghasilan antibodi adalah tinggi di kalangan pesakit TB manakala proliferasi limfosit tinggi di kalangan individu yang terdedah kepada TB tanpa gejala. Peptida P5 menunjukkan penghasilan antibodi paling tinggi di kalangan pesakit TB manakala peptida P7 menunjukkan gerak balas limfosit yang paling tinggi di kalangan individu yang terdedah kepada TB tanpa gejala.

Gen *mtp40* dilaporkan termasuk dalam kawasan RD5 iaitu salah satu daripada 10 kawasan yang terdelesi (RD1-RD10) pada *M. bovis* BCG jika dibandingkan dengan genom *M. tuberculosis*. RD5 mempunyai saiz 8964 bp dan berada dalam lokasi antara 2,635,067 dan 2,635,031. Kawasan terdelesi RD5 mengandungi 3 gen (*plcA*, *plcB*,

plcC) di mana ketiga-tiganya tidak terdapat pada *M. bovis*, *M. bovis* BCG dan *M. Microti* (Gordon *et al.*, 1999).

Ujian pengesanan menggunakan tindak balas rantai polimerase (PCR-"polymerase chain reaction) menggunakan sasaran gen *mtp40* dibangunkan untuk membezakan *M. tuberculosis* dari ahli kompleks *M. tuberculosis* yang lain. Contohnya PCR multipleks telah digunakan oleh Sinclair *et al.* (1995) menggunakan dua sasaran iaitu gen *mtp40* dan jujukan selitan IS986 dan kedua-duanya menunjukkan hasil yang positif. Del Portillo *et al.* (1995) pula menghasilkan sistem PCR multiprimer menggunakan antigen 32kDa (506 pasangan bes), IS986 (984 pasangan bes) dan *mtp40* (396 pasangan bes) dan didapati kaedah ini berkesan untuk membezakan strain mikobakteria yang pelbagai.

Liebana *et al.* (1996) pula menunjukkan PCR multipleks menggunakan 2 pasang primer bagi 2 gen iaitu *mtp40* dan IS986 boleh membezakan patogen manusia *M. tuberculosis* dan *M. africanum* dari patogen haiwan *M. bovis* dan *M. microti*. Walau bagaimanapun *mtp40* turut dijumpai dalam semua strain kompleks *M. tuberculosis* dari hidupan laut.

Ujian PCR berasaskan *mtp40* dilanjutkan oleh Herrera *et al.* (1996) ke atas spesimen klinikal. Kajian ini menunjukkan *mtp40* boleh membezakan *M. tuberculosis* dengan mikobakteria berkaitan yang lain termasuk *M. bovis* dan didapati ia lebih spesifik berbanding dengan IS6110. Teknik multipleks IS6110 dan *mtp40* juga telah dilakukan oleh Weil *et al.* (1996) di mana ianya boleh digunakan untuk membezakan *M. bovis* dan *M. tuberculosis*. Walau bagaimanapun, didapati bahawa tidak semua strain *M. tuberculosis* mengandungi gen *mtp40*.